

BIOTOOLS garantiza la conformidad de los productos con la cantidad y contenido indicado en el vial y etiquetas exteriores durante su periodo de vida media. La obligación de BIOTOOLS y los derechos del comprador bajo esta garantía están limitados bien al reemplazo por parte de BIOTOOLS de cualquier producto que sea deficiente en fabricación, y que deberá ser retornado a BIOTOOLS (portes pagados) o a opción de BIOTOOLS, devolución del precio de adquisición. Las reclamaciones por mercancía dañada durante el transporte han de ser dirigidas al transportista.

Este producto debe ser utilizado únicamente por profesionales cualificados y para uso exclusivo en investigación. Es la responsabilidad del usuario asegurarse que un producto determinado es adecuado para una aplicación determinada. Cualquier producto que no cumpla con las especificaciones indicadas en la hoja informativa de producto será reemplazado. Esta garantía limita nuestra responsabilidad al reemplazo del producto. Ninguna otra garantía, de ningún tipo, expresa o implícita, incluyendo, sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización o adecuación para un propósito determinado, son dadas por BIOTOOLS. BIOTOOLS no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidental resultante del uso, mal uso, los resultados del uso o la incapacidad de uso de ningún producto.

**Fabricado por:**

BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. han sido evaluados y certificados en cuanto a cumplimiento de los requisitos de la ISO 9001:2008 para las siguientes actividades: investigación y desarrollo de productos de biotecnología, fabricación de productos de biotecnología y fabricación de productos para diagnóstico in vitro (IVDs). Valle de Tobalina – 52 – Nave 39, 28021 Madrid – Spain

© 2009 BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Todos los derechos reservados

**BIOTOOLS**

BIOTOOLS B&M LABS. S.A.

BIOTOOLS B&M Labs, S.A.  
Valle de Tobalina - 52 - Nave 39  
28021 Madrid  
Spain

Tel. (34) 91 710 00 74

Fax (34) 91 505 31 18

E-mail: [info@biotools.eu](mailto:info@biotools.eu)

[www.biotools.eu](http://www.biotools.eu)



## BIOTOOLS HIGH RETROTRANSCRIPTASE-STARTER KIT

REF.	FORMATO	CONTENIDO
10.081	50 rxns	<b>Biotools High Retrotranscriptase-Starter Kit</b>
10.082	100 rxns	<b>Biotools High Retrotranscriptase-Starter Kit</b>
10.091	50 rxns	<b>Biotools High Retrotranscriptase-Starter Kit with Random Primers</b>
10.092	100 rxns	<b>Biotools High Retrotranscriptase-Starter Kit with Random Primers</b>
10.061	50 rxns	<b>Biotools High Retrotranscriptase-Starter Kit with Oligo (dT) Primer</b>
10.062	100 rxns	<b>Biotools High Retrotranscriptase-Starter Kit with Oligo (dT) Primer</b>

Almacenar a -20°C

**Uso exclusivo en investigación. No para uso en procedimientos diagnósticos**

**Aviso a usuarios:** Algunas de las aplicaciones que pueden llevarse a cabo con este producto están cubiertas por patentes aplicables en ciertos países. La adquisición de este producto no incluye o provee de una licencia para realizar aplicaciones patentadas. En algunos casos, los usuarios tienen la obligación de adquirir una licencia, dependiendo del país y/o la aplicación.

Ed. 06 - Marzo 19

### 1. DESCRIPCIÓN

**Biotools High Retrotranscriptase-Starter Kit** es un sistema completo para la síntesis eficiente de la primera cadena de ADNc. El kit utiliza la Biotools High Retrotranscriptase, una nueva retrotranscriptasa recombinante termoestable que carece de actividad RNasa H. Esta enzima permite la síntesis de ADNc en un rango amplio de temperatura, entre 40°C y 65°C, resolviendo problemas frecuentes de moldes ricos en GC y/o con elevado porcentaje de estructuras secundarias sin la incorporación de aditivos de reacción.

El Biotools High Retrotranscriptase-Starter Kit se suministra con *Oligo (dT)<sub>15</sub> Primer* y/o *Random Primers*. Los *Random Primers* se unen de forma inespecífica y permiten sintetizar la primera hebra de ADNc utilizando como molde todos los ARNs presentes en la muestra. El *Oligo (dT)<sub>15</sub> Primer* anilla selectivamente en la cola poly(A) del extremo 3' del ARN, sintetizando ADNc sólo a partir de los ARNm. En tanto, los primers específicos de secuencia pueden ser utilizados con el kit para la síntesis del ADNc a partir de un ARN específico. Entre los componentes del kit se encuentra un inhibidor de RNasas recombinante, *High RNase Inhibitor*, que protege al ARN de su degradación por RNasas A, B y C.

La primera cadena de ADNc sintetizada por la Biotools High Retrotranscriptase puede ser utilizada para ensayos posteriores como: clonaje, RT-PCR y qRT-PCR.

### 2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

- Biotools High Retrotranscriptase:** Proviene en buffer de almacenamiento: Tris-Acetate 5 mM (pH 8.0), KCl 15 mM, EDTA 1.5 mM, inhibidores de proteasas y glicerol 50% (v/v).
- 10X High RT Reaction Buffer:** Tris-HCl 100 mM (pH 9.0), KCl 500 mM y DTT 1 mM.
- 100 mM MgSO<sub>4</sub> Solution**
- High RNase Inhibitor:** Este inhibidor se proporciona a una concentración de 40 U/μl en buffer de almacenamiento: HEPES-NaOH 20mM (pH 7.5), NaCl 50 mM, DTT 8 mM, detergente ELUGENT™ 0.03% (v/v) y glicerol 50% (v/v).
- Oligo (dT)<sub>15</sub> Primer:** Suministrado en alguna de las versiones del kit en formato liofilizado (30μg, 6.7nmol).
- Random Primers:** Suministrado en alguna de las versiones del kit en formato liofilizado (30μg, 17nmol).
- dNTP Mix, 10 mM each:** La mezcla de los cuatro deoxinucleótidos (dATP; dCTP; dGTP y dTTP) se suministra a una concentración equimolar (10 mM de cada uno) en solución acuosa.
- Nuclease Free Water**

### 3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Los *Random Primers* y *Oligo (dT)<sub>15</sub> Primer* son suministrados en formato liofilizado y pueden ser conservados a 4°C o a -20°C. Una vez resuspendidos en agua libre de nucleasas a una concentración adecuada (ej. 0.5 μg/μl) los primers deberán conservarse a -20°C.

Los demás componentes del kit se conservan a -20°C en un congelador de temperatura constante hasta la caducidad indicada en la etiqueta respectiva.

**Evitar la exposición de los reactivos a cambios de temperatura frecuentes.**

Para uso rutinario realizar alícuotas a fin de reducir los ciclos de congelación/descongelación.

### 4. CONSIDERACIONES GENERALES

**Molde:** El éxito de la transcripción inversa depende en gran medida de la integridad y pureza del ARN utilizado como molde. Las muestras de ARN deben de tener una ratio  $A_{260/280} \geq 1.7$ . Para obtener resultados óptimos el ARN molde debe encontrarse libre de ADN contaminante. Una proporción pequeña de ADN genómico residual en las muestras de ARN puede ser amplificada junto con el ADNc. A fin de eliminar el ADN contaminante, las muestras de ARN pueden ser previamente tratadas con DNasa I libre de RNasas.

La presencia de residuos de purificación en la muestra (ej. SDS, NaCl, heparina, tiocianato de guanidina) puede interferir con la amplificación del ADNc. Los inhibidores pueden eliminarse incluyendo un paso de purificación adicional con etanol seguido de un lavado con etanol 70%. Nosotros recomendamos utilizar el Speedtools Total RNA Extraction kit para la purificación del molde de ARN.

Para la síntesis de la primera hebra de ADNc puede utilizarse como molde ARN total o ARNm; el ARN total suele ser suficiente para la mayoría de los análisis de RT-PCR. La cantidad de ARN necesaria para llevar a cabo la síntesis de ADNc depende de la abundancia del ARN de interés, del tipo de molde utilizado y del cebador seleccionado. Las cantidades recomendadas se encuentran entre 10 ng y 5 μg para ARN total y entre 1 ng-500 ng para ARNm.

**Concentración de MgSO<sub>4</sub>:** La concentración de MgSO<sub>4</sub> en la reacción debe ser optimizada para cada combinación de molde/primer. Nosotros recomendamos comenzar con una concentración de 3 mM.

**Selección de Primer:** La selección del cebador adecuado para la transcripción inversa variará dependiendo del molde de ARN (ej. contenido en GC, presencia de estructuras secundarias, entre otras) pudiendo seleccionarse entre *Oligo (dT) Primer*, *Random Primers*, o un primer específico de secuencia.

El *Oligo (dT)<sub>15</sub> Primer* es utilizado para anillar con la cola poli(A)+ de los ARNm de eucariotas. Este cebador suele garantizar la síntesis de ADNc más extensos, siendo el primer de elección cuando se busca sintetizar ADNc *full-length*. Concentración recomendada: 1-10 μM en la mezcla de reacción.

Los *Random Primers* hibridan en diferentes puntos de la secuencia del molde y son de gran utilidad tanto para moldes de ARNm largos como para moldes con un porcentaje elevado de estructuras secundarias. En caso de utilizar *Random Primers* para la síntesis de ADNc, la proporción de primer y molde deberá seleccionarse en función de la extensión del producto deseado; ratios superiores producen ADNc más cortos. Nosotros recomendamos utilizar entre 150-250 ng de primer como punto de partida para la optimización.

El uso de *Primer Específico de Secuencia* permite el anillamiento a un segmento definido del molde y se utiliza para la síntesis de ADNc a partir de un ARNm específico; su uso está recomendado cuando la cantidad de molde es limitante y se busca un ADNc en particular. El primer deberá tener una Tm elevada para realizar la retrotranscripción entre 45-47°C (temperatura óptima de la High Retrotranscriptase). La concentración de primer es conveniente optimizarla experimentalmente y suele variar entre 0.1-1 μM.

Biotools dispone de diferentes variantes del *High Retrotranscriptase-Starter Kit*. La versión más completa (*High Retrotranscriptase-Starter Kit*) se suministra con *Oligo (dT)<sub>15</sub> Primer* y *Random Primers*, las demás versiones sólo incluyen una de las variantes de primers: *Oligo (dT)<sub>15</sub> Primer* o *Random Primers* (ver Información para Pedidos en el punto 7).

**High RNase Inhibitor:** Es un inhibidor de RNasa recombinante de mamíferos suministrado a una concentración de 40 U/μl. El *High RNase Inhibitor* protege al ARN de su degradación y mejora el rendimiento del ADNc sintetizado. Este inhibidor bloquea, mediante unión no competitiva, la actividad de un espectro amplio de RNasas incluyendo las RNasas A, B y C.

**Síntesis de ADNc:** Si bien la Biotools High Retrotranscriptase no requiere una etapa de *desnaturalización previa a la extensión*, ésta puede incluirse incubando en un tubo independiente sólo el primer y el molde de ARN a 95°C durante 2 min (o bien 10 min a 65°C). **No incubar la enzima a 95°C, ésta puede inactivarse.** Una vez finalizado este proceso la mezcla de primer y molde se refrigera y se adiciona a la mezcla de reacción.

**Temperatura:** La Biotools High Retrotranscriptase es una transcriptasa inversa termoestable que trabaja en un rango amplio de temperatura, entre 40-65°C. Nosotros recomendamos realizar la retrotranscripción a **45-47°C** ya que además de ser la temperatura de trabajo óptima de esta enzima, minimiza complicaciones ocasionadas por la presencia de estructuras secundarias o de un contenido en GC elevado en el molde, y favorece la síntesis del ADNc *full-length*.

La temperatura idónea para la síntesis de ADNc depende no sólo de la transcriptasa inversa sino también de la longitud del ADNc deseado, del contenido en GC del molde de ARN y del cebador seleccionado para llevar a cabo la síntesis. Para transcritos >4kb incrementar el tiempo de elongación hasta 60 min. Para favorecer la obtención de ADNc *full-length* se recomienda realizar la transcripción inversa a temperaturas más bajas por períodos de tiempo prolongados (≤60min).

En caso de utilizar *Random Primers*, es conveniente reducir la temperatura de incubación para favorecer el anillamiento con el molde de ARN. Para estos cebadores se recomienda realizar la síntesis de ADNc en dos etapas: 10 min a 25°C seguido de 30 min a 47°C. Para *Oligo (dT)<sub>15</sub> Primer* la extensión se podrá realizar alrededor de los 47°C.

**Cantidad de Biotools High Retrotranscriptase:** utilizar entre 0.25-1 μl de enzima por reacción de 20 μl, dependiendo de la cantidad de molde en la reacción. Utilizar aproximadamente 0.5 μl para 1 μg de molde de ARN total.

## 5. PROTOCOLO PARA LA SÍNTESIS DE ADNc

**Materiales que deberán ser aportados por el usuario:**

- Molde de ARN

A fin *minimizar el riesgo de contaminación con RNasas utilizar guantes libres de polvo, material plástico estéril y libre de nucleasas y puntas con filtro.*

1.-Descongelar los reactivos necesarios y mantenerlos en hielo. Realizar una centrifugación rápida antes de su dispensación. Es recomendable incluir un control de reacción sin Biotools High Retrotranscriptase a fin de examinar la posible contaminación de las muestras con ADN.

2.-**Opcional:** Preparar la *mezcla de molde/primer* en viales de reacción libres de nucleasas y mantenerlos en hielo (ver instrucciones en Tabla 1).

**TABLA 1. Preparación de la mezcla molde/primer**

COMPONENTE	Concentración Final	15 μl rxn
ARN Molde	variable*	x μl
Oligo (dT) <sub>15</sub> Primer	1-10 μM	x μl
O <i>Random Primers</i>	150-250 ng	x μl
O Primer Específico	0.1-1 μM	x μl
Agua libre de nucleasas	-	Hasta 15 μl

\*10ng-5μg de ARN total ó 1-500ng de ARNm

3.- **Desnaturalización:** Incubar 2 min a 95°C (ó 10 min a 65°C). Enfriar y mantener los viales en hielo.

4.- Preparar la *mezcla de reacción* en un microtubo estéril en hielo siguiendo las instrucciones de la Tabla 2. La mezcla de reacción puede ser utilizada para amplificar moldes de ARN problemáticos, controles positivos y negativos. Preparar suficiente mezcla para el número de reacciones deseado y mantenerla en hielo.

**TABLA 2. Preparación de la mezcla de reacción**

COMPONENTE	Concentración Final	20 μl rxn
10X High RT Reaction Buffer	1X	2 μl
100mM MgSO <sub>4</sub> Solution*	3 mM	0.6 μl
dNTP Mix, 10mM each**	0.2-0.5 mM de c/u	0.4-1 μl
High RNase Inhibitor (40U/μl) <sup>†</sup>	1U/μl	0.5 μl
Agua libre de nucleasas	-	Hasta 5 μl
<b>Biotools High Retrotranscriptase</b>	-	0.5 μl

\* Utilizar 3mM como punto de partida

\*\* Utilizar 0.5mM de c/u como punto de partida

<sup>†</sup> Opcional

5.-Dispensar 5 μl de la mezcla preparada (Tabla 2) en los viales de reacción y mantenerlos en hielo. Evitar la contaminación cruzada durante la dispensación.

6.-Agregar 15 μl de la *mezcla ARN/primer* desnaturalizada (Tabla 1) para alcanzar un volumen final de reacción de 20 μl por tubo.

7.- Cerrar los viales, mezclar su contenido y centrifugar brevemente.

8.-**Extensión:** Incubar a 47°C durante 30 min. Para *Random Primers* incubar a 25°C durante 10 min y a continuación 30 min a 47°C (ver síntesis de ADNc).

9.-**Inactivación:** Inactivar la Biotools High Retrotranscriptase incubando la mezcla de reacción a 85°C por 5 min.

10.-Colocar los tubos en hielo. El ADNc generado puede conservarse a 4°C durante 1-2 h o bien a -20°C por períodos más prolongados.

11.-Para la amplificación posterior por PCR o qPCR se recomienda comenzar con un volumen aproximado de ≤ 1/10 del volumen final de reacción, aunque es conveniente optimizar experimentalmente la cantidad de producto a utilizar.

## 6. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

### Bajo rendimiento de reacción

1. **Corroborar la cantidad y calidad del molde.** Verificar la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante, y la cantidad por fluorimetría. Repurificar el ARN en caso de degradación.

-Un *exceso de ARN* puede reducir el rendimiento de la reacción.

-*Concentración de molde reducida o nula:* Utilizar como molde ARNm poly(A)+ a fin de incrementar la proporción del ARNm de interés.

-*Presencia de inhibidores en la muestra:* Reducir el volumen de molde en la reacción; realizar una etapa de purificación adicional (precipitación con etanol) o cambiar el método de purificación utilizado.

-Asegurarse de que los reactivos y el material plástico utilizados se encuentren libres de RNasas.

2. **Contaminación con RNasas.** Proteger el ARN de la degradación por ribonucleasas durante la síntesis del ADNc incluyendo el *High RNase Inhibitor* en la mezcla de reacción. Tener presente que el *exceso* de algunos inhibidores puede interferir en la RT-PCR. Utilizar material plástico libre de RNasas.

3. **Problemas con los primers.** Verificar el diseño del primer, las condiciones de conservación y la concentración utilizada.

-Verificar que el primer específico de secuencia pueda pegarse al ARNm (complementario a la secuencia *downstream* del ARN).

-Rediseñar el primer específico o seleccionar Oligo (dT) Primer o *Random Primers* para la síntesis del ADNc.

-*La concentración de primer es muy baja.* Incrementar la concentración en la mezcla de reacción.

-*Problemas con el anillamiento del primer.* En caso de utilizar Oligo (dT) Primer o *Random Primers* verificar que la temperatura y el tiempo de incubación seleccionados sean los idóneos.

4. **Condiciones de reacción no-óptimas.**

-*Optimizar la concentración de MgSO<sub>4</sub>,* la temperatura y el tiempo de extensión.

-*Moldes de concentración baja, con alto contenido en GC y/o estructuras secundarias* suelen requerir mayor tiempo de extensión: prolongar la incubación hasta 60 min. El rendimiento de reacción puede incrementarse realizando la transcripción inversa a baja temperatura durante un período de tiempo más prolongado (≤60 min).

-En caso de incluir una etapa de *desnaturalización* previa a la extensión asegurarse de **no incorporar** la Biotools High Retrotranscriptase ni el *High RNase Inhibitor* durante el proceso.

5. **Optimizar la concentración de enzima.** No utilizar más de 0.5 μl de Biotools High Retrotranscriptase para transcribir 1 μg de ARN total en un volumen de reacción de 20 μl. Para diferentes concentraciones de molde, modificar la cantidad de enzima en la reacción.

6. **Ausencia de algún componente de reacción.** Incluir en todos los ensayos un control positivo con una combinación de molde/primer previamente evaluada. Verificar la lista de reactivos y repetir el ensayo.

7. **Programación incorrecta del termociclador.** Verificar que los tiempos y temperaturas programadas sean los adecuados para el ensayo.

## 7. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Componentes	Referencias					
	10.081	10.082	10.091	10.092	10.061	10.062
<i>High Retrotranscriptase</i>	30 μl	55 μl	30 μl	55 μl	30 μl	55 μl
<i>10 X High RT Reaction Buffer</i>	1.8 ml	1.8 ml	1.8 ml	1.8 ml	1.8 ml	1.8 ml
<i>100 mM MgSO<sub>4</sub> Solution</i>	1.8 ml	1.8 ml	1.8 ml	1.8 ml	1.8 ml	1.8 ml
<i>High RNase Inhibitor (40U/μl)</i>	1 x 1000U	2 x 1000U	1 x 1000U	2 x 1000U	1 x 1000U	2 x 1000U
<i>dNTP Mix, 10 mM each</i>	1 x 60 μl	2 x 60 μl	1 x 60 μl	2 x 60 μl	1 x 60 μl	2 x 60 μl
<i>Nuclease Free Water</i>	2 x 1.8 ml	4 x 1.8 ml	1 x 1.8 ml	2 x 1.8 ml	1 x 1.8 ml	2 x 1.8 ml
<i>Oligo (dT)<sub>15</sub> Primer</i>	1 x 30 μg	2 x 30 μg			1 x 30 μg	2 x 30 μg
<i>Random Primers</i>	1 x 30 μg	2 x 30 μg	1 x 30 μg	2 x 30 μg		